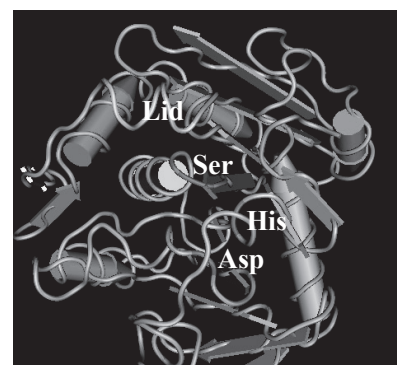


## [9] 繊維加工への応用を目指したリパーゼ変異体ライブラリーの構築と高機能変異体の取得

末 信一郎、倉田誠一、岩崎絵梨

## 1. 緒言

リパーゼは主にエステル結合の加水分解を触媒する酵素であるが、逆反応であるエステル合成やエステル交換等の多様な反応も触媒するため、産業において最も実用化されている酵素の一つである。リパーゼは由来により分子量や立体構造が異なっているにも関わらず、触媒基は Ser, His, Asp または Glu 残基からなり、lid 部位と呼ばれる両親媒性の $\alpha$ -ヘリックス状の構造で覆われている (Fig. 1)。この部位が基質との接触により可動し、酵素表面に触媒ポケットが露出することにより、酵素活性を制御している。本研究ではこの lid 部位に着目し、*Rhizopus oryzae* (クモノスカビ) 由来のリパーゼ (ROL) 酵母細胞表面提示プラスミドである pWIFSPROROL の ROL 遺伝子配列中の lid 部位にコンビナトリアル変異導入を行い、ROL 変異体表面提示酵母のコンビナトリアルライブラリーを構築した。このコンビナトリアルライブラリーを用いてセルロースアセテート (CA) の脱アセチル化の機能向上株や脂肪酸エステルに対する基質特異性の変化した変異体の取得を目的として、lid 部位のアミノ酸残基置換に基づく酵素性質の変化について検討を行った。

Fig. 1 The 3-D structure of *Rhizopus oryzae* lipase

## 2. 実験方法

酵母細胞表面提示プラスミドである pWIFSPROROL の ROL 配列が持つ lid 部位の 6 アミノ酸残基に対してコンビナトリアル変異の導入を行うために QuikChange®法の 2 種の方法を用いて ROL 変異体プラスミドを構築した。そして、この変異体プラスミドを用いて酵母 *Sacchaomyces cerevisiae* MT8-1 の形質転換を行い、ROL 変異体コンビナトリアルライブラリーの構築を行った。

## 3. 結果と考察

構築したライブラリーについて、まず CA に対する脱アセチル化反応の向上した変異体の取得を試みたが、スクリーニングの結果、活性の上昇した変異体を取得できなかった。これは、ROL 自体が CA に対する脱アセチル化活性が低く、lid 部位のみの変異導入では効果的な活性上昇が見込めないことが考えられる。次に、食品加工において有用な短鎖脂肪酸エステルの加水分解反応の効率化を目指して、構築したライブラリーのスクリーニングを行い、脂肪酸エステルに対する ROL の基質特異性の変化について検討した。その結果、基質特異性が変化した変異体を取得したが (Table 1)、野生型と比べ全ての基質に対して活性が低下していた (Fig. 2)。現在、さらに脂肪酸エステルの基質特異性についてスクリーニングを進めることにより、変異導入の影響による酵素性質の変化の検討を行っている。

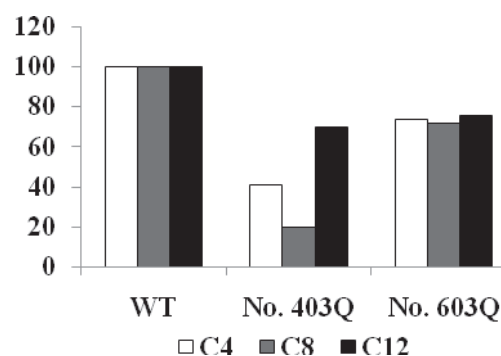


Fig. 2 Relative activity for fatty acid ester of WT and mutant

Table 1 Amino acids sequences of lid domains of ROL mutants

Clone No.	Amino acid sequence					
Wild type	F	R	S	A	I	T
403Q	G	H	N	G	L	G
603Q	G	R	I	A	D	G